

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 200426062

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

前列腺癌相关基因 *PC-1* 功能研究及其调控
通路初探

Researches on function and regulation pathway of prostate
cancer related gene *PC-1*

李 素 萍

指导教师姓名: 陈 亮 教授

周 建 光 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期: 2007 年 6 月

论文答辩日期: 2007 年 6 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: 陶 涛 教授

评 阅 人: _____

2007 年 6 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
前言.....	5
1 前列腺癌背景介绍.....	5
2 TPD52 家族研究进展及前列腺癌相关基因 <i>PC-1</i>	6
3 雄激素受体 AR 在前列腺癌进展中的扮演的角色.....	8
4 RTK 信号通路 与鸟嘌呤核苷酸交换因子简介.....	11
第一部分 <i>PC-1</i> 基因功能研究.....	15
1 材料与方法.....	15
1.1 材料.....	15
1.2 实验方法.....	17
2 结果与分析.....	23
2.1 建立稳定转染 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-PC-1 的 C4-2B 细胞株.....	23
2.2 雄激素对稳定转染 PC-1 基因 C4-2B 细胞株生长的影响.....	24
2.3 <i>PC-1</i> 基因提高 C4-2B 细胞形成集落的能力.....	24
2.4 <i>PC-1</i> 基因高表达对 C4-2B 细胞基因表达谱的影响.....	26
3 小结与讨论.....	27
第二部分 <i>PC-1</i> 基因调控通路初探.....	30
1 材料与方法.....	30
1.1 材料.....	30
1.2 实验方法.....	31
2 结果与分析.....	38
2.1 Real-time PCR 对芯片中 <i>EphA3</i> 、 <i>SGEF</i> 表达量变化的验证.....	38
2.2 <i>SGEF</i> / <i>CSGEF</i> 基因在前列腺癌细胞系中的功能初探.....	38
2.2.1 <i>SGEF</i> / <i>CSGEF</i> 的细胞系表达谱.....	40

2.2.2 <i>SGEF/CSGEF</i> 表达与 <i>PC-1</i> 的关系.....	41
2.2.3 <i>SGEF/CSGEF</i> 表达与雄激素的关系.....	42
2.3 鸟苷酸交换因子SGEF与EphA3之间的关系.....	43
2.4 SGEF与AR的关系.....	44
2.4.1 GST-pull down实验证明SGEF与AR相互作用.....	44
2.4.2 Co IP免疫共沉淀实验证明SGEF与AR在体内相互作用.....	44
2.4.3 GST-pull down实验确认SGEF与AR相互作用的结构域.....	45
2.4.4 哺乳动物双杂交实验确认AR与SGEF相互作用的结构域.....	46
2.4.5 SGEF/CSGEF对AR转录活性影响的探讨.....	48
2.5 SGEF兔多克隆抗体的制备.....	49
2.5.1 二免后第一次ELISA检测结果.....	49
2.5.2 二免后第一次ELISA检测结果.....	50
2.5.3 SGEF/CSGEF兔抗血清做western检测结果.....	52
3 小结与讨论.....	52
结论.....	54
参考文献.....	55
缩略词表.....	60
引物.....	61
致谢.....	64

CONTENTS

Chinese abstract.....	1
English abstract.....	3
Introduction.....	5
1 Background of prostate cancer.....	5
2 Advanced studies on Tumor Protein D52 and prostate related gene <i>PC-1</i>	6
3 The role androgen receptor played in prostate cancer progression.....	8
4 Introduction on RTK signal pathway and GEFs.....	11
Part I Functional Researches on <i>PC-1</i> gene.....	15
1 Materials and Methods.....	15
1.1 Materials.....	15
1.2 Methods.....	17
2. Results and analyses.....	23
2.1 Construction of stable transfected C4-2B with pcDNA3.1-PC-1 and pcDNA3.1.....	23
2.2 Androgen contributed to C4-2B cell lines stable transfected with <i>PC-1</i>	24
2.3 <i>PC-1</i> enhanced clony formation ability of C4-2B.....	24
2.4 <i>PC-1</i> changed the gene expression profile of C4-2B.....	26
3. Summary and Discussions.....	27
Part II Elementary researches on the signal pathway <i>PC-1</i> regualted.....	30
1. Materials and Methods.....	30
1.1 Materials.....	30
1.2 Methods.....	31
2. Results and analyses.....	38
2.1Real-time PCR methods to verify the expression level of EphA3 and SGEF.....	38
2.2 Studies on the function of <i>SGEF/CSGEF</i> in prostate cancer.....	38
2.2.1 The expression profile of <i>SGEF/CSGEF</i> among different cell lines.....	40
2.2.2 The relationship between <i>SGEF/CSGEF</i> expression and PC-1.....	41

2.2.3 The relationship between <i>SGEF/CSGEF</i> expression and AR.....	42
2.3 The relationship between <i>SGEF/CSGEF</i> and EphA3.....	43
2.4 The relationship between <i>SGEF</i> and AR.....	44
2.4.1 GST-pull down indicated <i>SGEF</i> interacted with AT in vitro.....	44
2.4.2 Co IP indicated that <i>SGEF</i> interacted with AR in vivo.....	44
2.4.3 GST pull down indicated the domain of <i>SGEF</i> interacted with AR.....	45
2.4.4 Mammalian two-hybrid indicated the domain of AR interacted with <i>SGEF</i>	46
2.4.5 Researches on AR transcription activity <i>SGEF/CSGEF</i> produced.....	48
2.5 Preparation of rabbit polyclonal antibody.....	49
2.5.1 The result of ELISA 7 days after second immunifaction.....	49
2.5.2 The result of ELISA 14 days after second immunifaction.....	50
2.5.3 The result of western blot with rabbit polyclonal antibody.....	52
3. Summary and Discussions.....	52
Conclusions.....	54
References.....	55
Abbreviations.....	60
Primers.....	61
Acknowledgement.....	64

摘 要

PC-1 基因是周建光研究员发现并克隆的新基因, 该基因在雄激素非依赖、可转移的前列腺癌晚期细胞系 C4-2 中高表达, 而在雄激素依赖、不转移的前列腺癌早期细胞系 LNCaP 中低表达。*PC-1* 属于癌蛋白 TPD52 家族, 编码一个包含 224 个氨基酸的蛋白分子, C 端 180 个氨基酸与 D52 家族蛋白序列高度同源的, N 端 46 个氨基酸是其特异的区域。TPD52 家族成员在多种类型肿瘤中高表达, 基因表达与细胞的增殖和恶变相关。不同于 TPD52 家族成员, *PC-1* 基因表达受雄激素正调控, 主要在前列腺组织中表达。

前期的研究发现 *PC-1* 基因定位于染色体 8q21.1 区域, 该区域在前列腺癌组织标本中普遍扩增。利用前列腺癌的临床组织样本做免疫组化试验表明, *PC-1* 基因在前列腺癌和前列腺内皮增生 (PIN) 的样本中的表达普遍较正常前列腺样本中低。将 *PC-1* 基因在小鼠成纤维 NIH3T3 细胞中稳定性高表达的结果显示, 该基因可使永生化的 NIH3T3 细胞向恶性肿瘤细胞转化。前期的研究提示 *PC-1* 基因可能作为癌基因特异性的在前列腺癌中起作用。

为了研究 *PC-1* 基因表达在前列腺癌发展中的作用以及发挥作用的分子机制, 本研究首先建立稳定高表达 *PC-1* 基因的细胞株 C4-2B-*PC-1* 及其对照细胞株 C4-2B-*neo*。以这两个细胞株为基础, 利用 MTT 实验、软琼脂集落形成实验, 同时用 RT-PCR 和 Real time PCR 检测了基因表达谱的变化, 探讨 *PC-1* 基因在 C4-2B 细胞中的功能。我们发现 *PC-1* 基因高表达之后引起了 C4-2B 细胞的增殖和恶性程度的提高, 在撤除雄激素的条件下促进 C4-2B 细胞生长, 并能导致一系列生长分化基因表达的改变。为了研究 *PC-1* 基因发挥功能的分子机制, 我们进一步研究了 LNCaP-*PC-1* 和对照细胞中受 *PC-1* 基因表达所调控的基因, 重点研究了受体酪氨酸蛋白激酶 (RTK) 信号通路成员 EphA3 和 SGEF/CSGEF。通过一系列实验探讨了这两个分子的功能, 尝试着去解释 *PC-1* 基因发挥功能的方式, 其参与的信号的通路, 或者受其调控的通路。我们的结果证明 EphA3 和 SGEF/CSGEF 能够发生相互作用, 而 EphA3 和 SGEF/CSGEF 是 *PC-1* 基因的应答分子, 提示 *PC-1* 基因可能通过调控 RTK 信号通路来影响前列腺癌的发生发展。

利用 GST pull down 实验, 免疫共沉淀实验 Co-IP 实验发现 SGEF 与雄激素受体 AR 能够在体内体外相互作用。进一步利用 GST pull down 实验和哺乳动物

双杂交实验确定与 AR 发生相互作用的区域是 SGEF 的 PH domain, 而与 SGEF 发生相互作用的是 AR 的配体结合结构域 LBD。另外独立的研究证明 PC-1 能够与 AR 发生相互作用, 由雄激素激活的雄激素受体信号通路在前列腺的分化、维持和前列腺癌的发展中起到重要的作用, 而我们的研究提示 *PC-1* 基因参与的 RTK 信号通路与雄激素受体信号通路之间存在着某种联系, 同时也说明 *PC-1* 基因参与的调控体系是一个复杂的网络。

为研究 *SGEF/CSGEF* 在前列腺癌中的功能, 我们制备了其兔多克隆抗体。得到了特异性较好, 效价较高的兔抗血清。

为了研究与 AR 相互作用的 SGEF 对雄激素受体的转录激活活性的影响。我们进一步在 LNCaP 细胞的瞬时转染体系中利用 PSA-Luc 和 ARE-Luc 的报告基因进行分析, 发现 *SGEF/CSGEF* 对 AR 的转录活性没有明显的影响。

本研究从细胞和分子水平研究了 *PC-1* 基因在前列腺癌发展中的作用, 并对其参与的信号通路做了初步的探讨。为确立 *PC-1* 基因作为前列腺癌新的治疗靶标提供了分子生物学基础。

关键词: *PC-1* 基因; 受体酪氨酸蛋白激酶信号通路; 鸟苷酸交换因子

ABSTRACT

PC-1 was identified to be up-regulated in androgen-refractory prostate cancer cell line C4-2, compared with androgen sensitive parent cell line LNCaP, which was first cloned by professor Zhou Jian-guang. *PC-1* belongs to Tumor Protein D52 family, many members of which are associated with a series of cancer and proliferation. The *PC-1* protein contains 224 amino acids, the N-terminal 46 amino acids of which is unique, while the C-terminal 180 amino acids is highly homologous with D52 protein. *PC-1* gene expression can be induced by androgen and predominantly expresses in prostate tissue.

Previous studies reveal that *PC-1* gene is located in 8q21.1 region of chromosome, which is frequently amplified in prostate cancer tissues. Immunohistochemical experiments reveal that *PC-1* gene expression is predominantly up-regulated in prostate cancer tissue samples and prostate intraepithelial neoplasia (PIN), whereas remaining a low level in normal prostate tissue samples control. Moreover, immortalized NIH3T3 cells stably transfected with *PC-1* expressing plasmid is transformed and display characteristics of malignant cancer cells. These results indicate that *PC-1* possess some characteristics of oncogene and may play a particular role in prostate cancer progression.

In this article, further investigation is performed to elucidate the biological functions of *PC-1* gene in prostate cancer progression and the molecular mechanism mediating the functions of this gene. Firstly, gain-of-function analysis was implemented in C4-2B prostate cancer cell lines, cell clones constitutively expressing *PC-1*, and their mock-transfected counterparts were generated. MTT and colony anchor-independent growth in soft agar were performed to evaluate the effects of *PC-1* gene expression on prostate cancer progression. RT-PCR and realtime PCR were used to analysis the expression of differential genes between C4-2B-*PC-1* and C4-2B-*neo* cell lines. A series of experimental data demonstrated that that stable expression *PC-1* was in positive correlation with prostate cancer malignancy, which enhanced the growth ability, changed growth and differentiate related gene expression of

C4-2B cells. In order to explore the molecular mechanism of *PC-1*, the *PC-1* regulated genes in LNCaP cell were further analyzed. There are Receptor Tyrosine protein Kinase signal pathway members EphA3 and SGEF/CSGEF among those responding genes, whose function were explored in order to identify the mechanism *PC-1* gene worked.

Our results showed EphA3 interacted with SGEF/CSGEF, which indicated that *PC-1* may play effect on prostate cancer development by regulating RTK signal pathway.

Both the results of GST pull down and co-immunoprecipitation showed that SGEF interacted with androgen receptor (AR). Moreover, SGEF interacted with AR mostly depending on its PH domain, and AR interacted with SGEF mostly depending on its Ligand Binding Domain according to the experiment of GST pull down and mammalian two-hybrid respectively. In fact, *PC-1* interacted with AR by other independent research. Androgen receptor(AR) triggered by androgen actions plays an important role in prostate development, maintenance of prostate organs and prostate cancer. Our research indicated that there was some relationship between RTK signal pathway and AR signal pathway, and that the regulating system *PC-1* participated was a complicate network.

In order to make further studies on SGEF/CSGEF, rabbit polyclonal antibody was prepared. Good specificity and potency polyclonal antiserum was gained.

PSA-Luc and AR-Luc reporting genes were used to analyze AR transcription activity in LNCaP cells, but the effects produced by SGEF/CSGEF is little.

In conclusion, our data provide cellular and molecular evidence to *PC-1* function in prostate cancer progression and its regulating signal pathway initiatorily, which gave molecular biologic grouding for *PC-1* to be a molecular marker for prostate cancer diagnosis.

Key words: *PC-1* gene; RTK Signal Pathway; Guanine nucleotide Exchange Factor

前 言

1 前列腺癌背景介绍

在欧美国家，前列腺癌是检出率最高的肿瘤，其致死人数在所有男性肿瘤中居第二位^[1]，每年大约有 40,000 美国男性死于前列腺癌^[2]。随着老龄人口的增加和生活环境的改变，我国前列腺癌发病率近年来呈不断上升趋势。前列腺癌是激素相关肿瘤，在其发展的早期受雄激素调控。因此除了对局部前列腺癌进行切除手术和放射治疗以外，通过手术或药物进行雄激素撤除治疗对早期的前列腺癌是唯一有效的治疗方法。然而，尽管在治疗初始阶段取得了明显的疗效，前列腺癌最终会复发并过渡到雄激素非依赖阶段，此时雄激素阻断治疗则不再起作用^[3]。前列腺癌将发展并转移至骨等器官，目前针对这一阶段的前列腺癌尚无有效的治疗方法。但是由于前列腺癌发病隐匿，大约有 60% 的病人在表现出临床症状时已处于癌症晚期。因此，了解介导前列腺癌发展的分子机制和相关基因对于发展新的治疗方法和靶标是非常重要的^[4,5]。

前列腺癌是由前列腺上皮细胞的转化、恶变引起的，这是一个多步骤多阶段的过程，初级阶段肿瘤细胞的生长与存活为雄激素依赖型，撤除雄激素或抗雄激素的内分泌疗法对病人有较好的疗效，而恶化程度较高的前列腺癌为雄激素非依赖型，内分泌疗法往往没有效果。1991 年，美国弗吉尼亚大学钟维国教授实验室建立了模拟人前列腺癌发展的 LNCaP 细胞模型。在该模型中，将成瘤性较低的人前列腺癌细胞系 LNCaP 与骨基质 MS 细胞共同接种裸鼠，八周后，对其进行阉割去势手术，经过一段时间，LNCaP 细胞和骨基质成纤维细胞系 MS 细胞形成的嵌合肿瘤继续生长，PSA 分泌增高，四周后进行肿瘤摘除，在体外培养，经细胞学和分子生物学进行来源鉴定后得到恶性化程度较高的雄激素非依赖的 C4 细胞系，若五周后进行摘除，则命名为 C5 细胞系。将 C4 细胞系再与 MS 细胞共接种至阉割去势的裸鼠皮下，十二周后摘除肿瘤体外培养，则获得雄激素非依赖具转移特征的 C4-2 细胞系切除睾丸获得了雄激素非依赖性的 C4-2 细胞株，该细胞代表了前列腺癌发展、恶性的更高阶段，具有强的致瘤性和转移性，C4-2 细胞转移到骨组织后形成的肿瘤被摘除进行体外培养，则获得 C4-2B 细胞

株。这株细胞具有定向骨转移的特性，恶性化程度更高^[6,7,8]。细胞遗传学（荧光原位杂交 FISH、比较基因组杂交 CGH）与分子生物学研究表明，在前列腺癌恶化过程中，细胞的核型及基因表达谱都发生了不可逆的转变。

人前列腺癌细胞模型的建立对前列腺癌细胞的生长、发展及转移的分子生物学研究提供了一套很好的途径，而目前研究认为前列腺癌的发生、发展和恶化可能与前列腺特异表达的基因有关。

2 TPD52 家族基因的研究进展与前列腺癌相关基因 PC-1

肿瘤蛋白D52家族近年来引起了人们的研究兴趣。第一个成员人D52最早是 J.A. Byrne等1995年在研究人乳腺癌上调表达基因中发现的^[9]。1996年Byrne等^[10]发现了人D53蛋白，序列的比对发现D53与人D52和鼠D52分别具有86%、52%的同源性，便将这些高度同源的基因/蛋白定义为一个新的家族。该家族成员分子中都含有一个叫做Coli-Coli基序的高度保守结构域，这个结构域在低等生物到哺乳动物或者同种生物的不同成员间也是高度保守的。第三个家族成员发现时就被命名为hD54^[11]。1999年和2002年，周建光等分别克隆了前列腺组织特异表达的人PC-1/PrLZ（Genbank: AF202897）和鼠mPC-1基因（Genbank: AY048852），它们也是TPD52家族新的成员^[12]。2004年，Ruoxiang Wang等报道PC-1/PrLZ具有前列腺组织特异性表达并与前列腺癌的进展有关^[13]。最近，Cao等人报道在睾丸组织特异的NYD-SP25即hD55^[14]。另外，在黑腹果蝇和秀丽线虫中也发现了D52-L的定向同源物^[10,15,16,17]。在人中发现的这些家族成员，大体分为四类D52、D53、D54、D55。

D52 家族基因均编码一个长约 180-200 残基的小的亲水多肽序列，包含一个大约 50 个氨基酸残基的典型的 Coli-Coli 基序结构，N 端和 C 端各有一个可能参与调节蛋白稳定性的 PEST 序列^[10]。Coli-Coli 基序结构对 D52 家族蛋白与同源或者异源其他蛋白发生相互作用的重要结构域^[15,18,19]。在已经发现的四类家族成员都具有这样的特征即 C 端序列具有特异性，N 端具有同源性，最保守的区域是中间序列，其中包括 Coli-Coli 结构。D52 家族的蛋白 PEST 结构域可能与蛋白水解机制调节其胞内丰度。有趣的是 D52 和 D53 位于 N 端的 PEST 结构域覆盖了 Coli-Coli 结构。可能，当蛋白的 Coli-Coli 结构发生相互作用的时候，PEST 的活性失去了，这与 Rechsteiner 等在 1988 年提出的 PEST 能够作为一定条件下

水解蛋白复合体信号的假说是一致的。

D52 家族蛋白在正常的生理状态下最重要的功能是调节膜泡运输和胞外分泌。大鼠^[16]和家兔^[17]中两种不同的 D52 定向同源物胃壁细胞胰腺腺泡在应对分泌刺激时能够发生磷酸化。在大鼠胰腺腺泡细胞中表达重组 D52 蛋白能够刺激淀粉酶的分泌, 粘膜细胞 T84 和大鼠胰腺腺泡细胞在促分泌素刺激下 D52 的定位发生变化, 从位于细胞核上相转到细胞质下层^[20,21]。在大鼠胰腺腺泡细胞和 PC12 细胞中 D52 分别共定位做早期的内含体上^[19,22]。很多的 D52/ D53 结合蛋白, 特别是磷脂结合蛋白 annexin VI、SNARE 蛋白突触融合蛋白 syx1 和 VAMP2, 与膜泡转运和脂筏运动相关^[18]。D53 能够增强 syx1 和 VAMP2 体外相互作用, D52 家族蛋白可能通过与膜整合蛋白、膜相关蛋白以及其他可溶性分泌蛋白结合而达到这些目的。

D52 在人的多种癌症中广泛扩增。人们在寻找能够提示乳腺癌发展变化中的新基因的过程中, 第一次发现 D52 差异表达。接着, 在肺癌中发现 D52 即 N8 高表达。随着研究的深入, 不断有发现 D52 及其家族成员在前列腺癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肝癌中广泛高表达。D52 家族基因扩增与肿瘤增生和病毒转导细胞增生相关。用促分化介质处理白血病细胞 HL-60 和 K-562 后 D52 和 D53 转录水平下降^[10], 逆转录病毒转导的 D52 能够促使鸡的神经胶质上皮细胞增生^[15], 又证实了 D52 家族基因表达与细胞增生相关。雌激素^[10]和雄激素^[13]都能分别促进 D52 及其家族成员的表达。

Boutros 等报道了 D53 是乳腺癌细胞系中受细胞周期调控的一种蛋白, 在 G2-M 期转换点, 表达升高, 在 M 期的前中期降解^[20]。与以前发现在成纤维细胞中的微阵列分析结果 D53 在 G2 期上调表达, 以及其在 HeLa 细胞中周期节律变化的结果是一致的^[23]。在 MDA-MB-231 细胞瞬时表达 pEGFP-D53 和 D52, 在整个 M 期均不发生降解而且能够使细胞出现多核现象, 在有丝分裂前中期降低 D52 家族蛋白表达, 细胞分裂便不能正常进行^[24]。对 D52 家族蛋白靶标功能分析的结果显示该家族蛋白具有其它的功能, 因此蛋白组学, 相互作用分析的研究以提供进一步的结果。有报道 *D. melanogaster* 基因组编码蛋白大规模相互作用的研究, D52 的同源物 CG 5174 在酵母双杂交系统中与多种蛋白发生相互作用, 其中包括 rad50, ash1 以及 14-3-3 蛋白^[24]。鼠肝免疫染色显示 mD52 定位在染

色质间颗粒^[21]，Boutros 等对人卵巢癌分析的结果显示 hD52 主要定位在细胞核内^[25]。这些结果表明 D52 蛋白家族可能在亚细胞器中发挥作用，而不仅仅是在它们最初发现的细胞质中发挥作用。

另外的研究表明该家族成员可以通过选择性剪接的方式产生功能不同的拼接体。D52 家族基因在多种癌症中广泛扩增，蛋白表达水平升高。目前认为，他们的基因功能可能与包括癌症在内的人类疾病相关，关于这个家族成员发挥作用的分子机制还有待于进一步的探讨。

1999 年，周建光研究员利用 Microarray 技术分析前列腺癌转移模型中 LNCaP 母系细胞和 C4-2 亚系细胞的基因表达差异，筛选并克隆了新基因 *PC-1*^[26]。*PC-1* 基因在 C4-2 中高表达，而在 LNCaP 细胞中低表达。*PC-1* 基因属于 TPD52(Tumor Protein D52) 家族，此家族的诸多成员和多种肿瘤及细胞增殖相关^[9,10,27]。*PC-1* 由 224 个氨基酸组成，除了 *PC-1* 特异性的 N 端和其稍短的 C 端，*PC-1* 和 D52 高度同源，且皆具有卷曲螺旋式的亮氨酸拉链结构，亮氨酸拉链的两翼有两个 PEST 位点，另外还具有多个 Ser/Thr 磷酸化位点，酪蛋白激酶 II、PKC、cAMP 和环状鸟苷单磷酸激酶底物位以及两个 N-糖基化位点。*PC-1* 和其他 D52 家族蛋白一样可能在翻译后受磷酸化、蛋白酶和糖基化修饰。*PC-1* 和 TPD52 皆在肿瘤组织中高表达，可能属于同一基因的不同剪接形式。而和其他 TPD52 成员不同的是，*PC-1* 基因主要在前列腺组织中特异表达，且受雄激素诱导表达。利用 *PC-1* 特异的探针进行 FISH 实验发现 *PC-1* 基因位于染色体 8q21.1，这个区域在前列腺癌样本中频繁扩增。利用 *PC-1* 特异性探针做原位杂交 FISH 实验发现 *PC-1* 基因在 67.5% 前列腺癌的样本中扩增；利用 *PC-1* 特异性的抗体进行免疫组化实验发现 *PC-1* 在 84.5% 的前列腺内皮增生 (PIN)、75% 的前列腺癌样本的恶性细胞中高表达^[12]。早期的研究还发现，稳定高表达 *PC-1* 基因的 NIH3T3 细胞获得成瘤性等多种恶性表型，表明 *PC-1* 基因可起始永生化的鼠成纤维细胞的恶性转化^[28]。这些实验证据提示 *PC-1* 基因具有癌基因的特点，有可能作为前列腺癌诊断和治疗的新靶点。

3 雄激素受体 AR 在前列腺癌进展中的扮演的角色

雄激素受体 (androgen receptor, AR) 是固醇类受体亚家族的一员，位于细胞核上，由位于 X 染色体 q¹¹⁻¹² 的单拷贝 AR 基因编码，该基因含有 8 个外显子和

7 个内含子。作为一种配体依赖性的核转录因子, AR 的一级结构可分为 N 端的转录激活区 (transcriptional activation domain, TAD)、居中的 DNA 结合区 (DNA binding domain, DBD) 及 C 端的配体结合区 (ligand binding domain, LBD) [29,30,31]。

雄激素受体在前列腺的发育、生长及维持中起关键作用, 同时它们在前列腺癌细胞的生长、存活、凋亡、转移与分化过程中发挥重要作用^[32,33,34]。在没有激素作用下, AR 与热休克蛋白 (HSP) 结合, 当配体雄激素与之结合后 AR 经历了结构上的变化, AR-HSP 复合体解离, 雄激素-AR 复合体进入胞核内, 自身发生二聚化, 识别靶基因内启动子上的雄激素反应元件 (AREs), 募集共激活或共抑制因子, 调节相应基因的表达, 进而发挥相应的生理功能, 此即为经典的 AR 信号通路——配体依赖性活化^[35]。

在前列腺癌研究的各个方面, 雄激素与前列腺癌的关系都相当重要, 因为前列腺癌的高危因素包括雄激素敏感性的增加与受体对雄激素的反应增强。雄激素对靶基因的作用是多态性的, 雄激素受体作为中心, 在介导雄激素的各种生物学效应, 并作用于下游的各种基因起重要作用。前列腺癌细胞依赖雄激素和 AR 生存, 但当雄激素剥夺治疗后, 却发展成为内分泌抵抗性前列腺癌, 提示了雄激素和雄激素受体与前列腺癌之间的关系的复杂性。

睾酮、双氢睾酮等配体可与 AR 的 C 端配体结合区结合, 激活 AR, 进入核内发挥作用, 但是 AR 的活化可能还可以通过配体非依赖的方式进行, 一些生长因子、激酶诱导剂等可激活 AR, 进入细胞核调节靶基因。AR 非依赖性激活的方式有二种, 一种是直接作用, 改变 AR 的结构及磷酸化状态, 有资料显示, 激活的 AR 是磷酸化的 AR, 磷酸化的 AR 可促进雄激素反应基因的转录; 另一种是间接作用, 通过蛋白与蛋白之间的相互作用增强 AR 的活性或减轻对 AR 活性的抑制而活化 AR。角化细胞生长因子 (KGF)、表皮生长因子 (EGF)、IGF-I 信号通路、蛋白激酶 A (PKA)、蛋白激酶 C (PKC) 等均可在无配体存在的条件下激活 AR, 而且不同的生长因子通路之间存在着生理性的交叉^[36, 37, 38]。近来研究提示, 增强因子及共激活因子 ARA70、ARA54、BAG-1L 等可通过与 AR 的蛋白及蛋白的相互作用降低 AR 活化对配体的浓度要求, 甚至在缺乏配体的情况下维持雄激素依赖的生长作用^[39]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库